

(1)

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number **2002171967**

(4) Date of publication of application: **18 06 02**

(51) Int. Cl.

C12N 5/06

C12M 1/00

C12M 1/00

// C12N 5/06 C12 1 91

(21) Application number: **2000371832**

(71) Applicant: **JAPAN SCIENCE TECHNOLOGY
CORP**

(22) Date of filing: **08.12.00**

(72) Inventor: **TA AGI MUTSUMI
YOSHIDA TOSHIOMI**

(54) **METHOD FOR IN VITRO CULTURE OF
HEMATOPOIETIC CELL GROUP**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a simple and effective method for culturing a hematopoietic cell group such as a hematopoietic stem cell, a hematopoietic precursor cell, etc.

SOLUTION: A substrate composed of a fabric is arranged in a medium. A stroma cell in a concentration of 1×10^2 – 4×10^5 cells/ml is inoculated into the medium and cultured. Then a hematopoietic cell in a concentration of 1×10^3 – 1.8×10^6 cells/ml is inoculated into the medium and cultured.

COPYRIGHT (C)2002 JPO

(10) 本国特許 (J P)

(12) 公

公

(A

(1) 特許願 番

2002 171967

2002 171967

(43) 日 平 14年6 1日(2002 6 18)

(51)I C

I

子 (参考)

C 1 2 N 5/06

C 1 2 M 1/00

C 4 B 0 2 9

C 1 2 M 1/00

3/00

A 4 B 0 6 5

3/00

C 1 2 R 1-91)

7 (C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

C 1 2 R 1-91)

C 1 2 R 1-91)

未請求 請求項の数5 〇 (全 5

(21)出 番号

-371832(P2000-371832)

(71)出 人 396020800

平成12 12月6日(2000 12 6)

県 市本 4 1番8号

(72)発 者 高木 睦

大阪 木市南春日E 5-1-55-211

(72)発明者 吉

大阪府大 市山田西2-4-A 1-505

(74)代 人 100093230

弁理 西澤 利夫

Fタ ム(参考) 4B029 AA02 BB11 CC02 DA10 DX10

GA03

4B065 AA93 BC41 CA44

(54) 明の

(57) 要

を $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ cells/ml の度 接
培 し $1 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^6$
cells/ml 濃 で接種して)

【0004】 造血幹細胞移植法は、予り患者に次

1. $1.0^2 \sim 4 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 濃度で
種、培養し、造血細胞群を $1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ の 度で接種し、培養す。造血細胞群

細胞を $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 濃度で接

り培養された造血細胞群のいずれかの造血細胞が、血液

【 頁5】 請求 4の方法により、造られる血液細胞

【 細な

【0001】

は、の出願の発明、骨、末梢、臍帯血などの少

【0002】

【従来の技術とその課題】 癌に 者、1990年
20万人であつたが、2010年に
80.0万人に近づくと推計されており (Pisani, P., Parkin,
D. M., Ferlay, J., Int. J. Cancer 83, 18-29 (1999))、日本 国でも1999年に17名、
29万人を たり、死者 11年入

【0003】 癌の治療法としては、これまで、薬剤

い、れも治療効果と同一に、と、強

程度、あるいはそれ以上に患者への負担が大きい、全身

いる。近年、骨髓と同様に末梢血中にも造血幹細胞が

が、要でないことから、臨床用が審みこ行われている

【0005】 このような造血幹細胞移植法には

に提供された細胞を用いる同種移植がある。自家骨髓移

植移植では、白血球型、が兄弟、25%、両親や
親戚では1%以下と低く、に登録された血ま

20

らの提供に頼らざるを得ない場、い、ま
た、いずれの場合も提供者は、最低数日入院する必要

上にも要る骨髓の採、の大きな負担を余なく

提出者への全身麻酔や血は必、ないものの、
末、中の造血幹細胞の含有率、通常は、な、低いた
め、抗癌剤や血球の増、し、こ、す、て、明

投与は、提供者に対して5日以上行われるが、その長

は、分な量の、細胞を採取、患、に、植するこ

1. 外では臍帯血、クを通して行うが、られる細胞量
られて、るた、移、能な患者は予りに見られて

【0006】 これらう、題を解決するため、近年、造
血幹細胞を提供者から必要量採、するのではなく、

活発に行われている、例、は、10、13697
8や、き、10、295369においては、特定の、東
型、D34、ま、び、またはc、k、(、)

の出願の発明に至った力である

培地に置き、培養支持体とし、ストロマ液を 1×10^6 $2-4 \times 10^6$ cells/ml の濃度で接種、培養した後、過剰な $1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$ cells/ml の濃度で接種しても培養することからである。

【００１７】この出願の発明の造 細胞群の培養方法に

【0007】また、特開2000-189157では、ヒト造血系由来（胚細胞増殖物、エキスビ）で得る方法される細胞の（ ）に成して液体培養増培地を交する性質

【0008】したがって、在のところで、毒血細胞を単に増殖させるための（ ）な方法は知られて

【0009】 この出 発の発明は 以上の およ

布において、繊維素材はどのようなものでも、でもよい。
セルロースなどの天然繊維、ポリエステル、
ナイロンなどの合成繊維、あるいはこれら
の混紡など、いずれも、繊維の太さや繊維の

がヨアヘン・トラチン・フ・プロネクチ：筆の天然の

【0010】

からなる支持体を、 4×10^5 cells/ml の濃度で接種し、造血細胞を 1×10^6 ~ 1.8×10^6 cells/ml の濃度で接種して培養する。細胞群の体内培養方法を提供する。

【0011】第2には、この出願の発明は、前記発明に
 係する

【0012】また、この第3には、培地からなる文庫を計し、ストロマ $1.4 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^4$ cells/ml の濃度で接種、培養して造血細胞

【0013】 乃出願の発明は、第4には、前記の骨髄細胞と、
 2. の、それらの造血細胞から血液細胞を分離する直

【0014】そして、この願の発明は、第5には、
第4の発明の方法によって製造され、も提

【0015】

胞を培養できることを明らかにしている (ytotech
glo y 34 121 130 (2000))。 説意研究を進

種微度の巨困において、とくに造血幹細胞や造血前駆

20 七されたものであっても、また、これらの布は、

り修飾したり、プラズマ 電処理など より表 に荷電

中に設置されていけばよく、その形状はとくに限定されな
ない。例えば、円形、方形などの任意の形状に加工され
て、よいし、円柱状、環状、立方体状などに成

【0018】この 臓の発明の造血細 の体外培 方

布を支持体として設置することにより、ストロマ細胞が繊維上に伸展し、造血細胞群（図5）

着した状態　　るいは骨髄の内部表面に接着したストロ

知られている。したがって、この「願の発明」について

【0019】この出願の発明の造血細胞群の体外培養が

の液体 1 が好 しく、イスコフ培地、PM 培地、 α M、M培 など、例示される。このような培地は、動物 胞培養に適した条件に調整す

血増殖因子を添してもよい。例えばIL-1、IL-3、IL-6、MGF (SCF)、GM-CSF、IL-3か、選択される1-7サイトカイン(特表平6-508987)やIL-1、IL-3、IL-6、IL-7を組み合わせたサイトカイン(特表平5-502385)、さらに、IL-3、IL-2、SCFを組み合わせたサイトカイン(特開平7-135969)の一種

【0020】この出願においては、まず、布を設けた培地にストロマ細胞を $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^5$ cell

ト、アル、ウシ、タビツ、ウマウスなどの骨髓、脂肪、歯肉等に出芽する造血幹細胞、内皮細胞、脂肪細胞、マクrophage、

では、接種された細胞は、培養により前記のとおりヒトの繊維上に付着する。ストロマ細胞を培養する条件は、ストロマ細胞の接種濃度が $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^5$ cells/

によれば、接種濃度が 1×10^2 cells/ml未満でも、 4×10^5 cells/mlより多くても、造血細胞は十分に増殖した。その条件は、上記のとおり種々の

れ、温度を選択すればよい。例えば、温度は $20 \sim 39^\circ\text{C}$ 、もしくは $33 \sim 37^\circ\text{C}$ とすることがあ

【0021】この出願の発明の造血細胞群の体外培養方法には、ストロマ細胞を培養した後に、さらに造血細胞を $1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^5$ cells/mlの濃度

【0022】この出願の発明において、「造血細胞群」とは、再生可能な造血幹細胞と造血幹細胞から分化した造血細胞を指す。このとき、造血前駆細胞とは

骨髄、脾臓、前駆細胞、造血細胞などを含む

前駆細胞であるが、厳密に知ることはほとんど不可能で

で「造血細胞群」と呼ぶ。つまり、この出願の発明の造血細胞群の培養法においては、原料となる造血

D34陽性細胞に精製した細胞等が例示される。

【0023】この出願の発明の造血細胞群の体外培養

【0024】この出願の発明の造血細胞群の体外培養方法によって得られた造血細胞群は、そのままの状態、あ

20 る不純物の除去をおこなった後、さらには、種々の

は操作をおこなうものである。好ましくは、感染症等の予防のためにも、精製された状態のものを、凍結あるいは液状に保存する。このような造血細胞群は、患者の体内において移植に用いられ

【0025】この出願の発明では、上記のとおり、血

し、ストロマ細胞を $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^5$ cells/mlの濃

血細胞群を $1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^5$ cells/mlの濃度で接種し、培養すれば、造血細胞群を体外培養することができ、このようにして得られた造血細胞群は、前記の

【0026】さらに、この出願の発明では、上記とお

が分化され、得られる。ここで、「血液細胞」とは、造血幹細胞から分化した血球まで、すべての造血細胞を

骨髄芽球、前駆細胞、好中球、好塩基球、リンパ球、Tリンパ球、Bリン

